

Д.В. Тапальский, В.А. Осипов, С.В. Жаворонок

КАРБАПЕНЕМАЗЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ И МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ

УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Приобретенные карбапенемазы являются важными детерминантами антибиотикорезистентности многих грамотрицательных бактерий, включая энтеробактерии, *Pseudomonas aeruginosa* и другие грамотрицательные неферментирующие бактерии. Эти ферменты принадлежат к молекулярному классу В (металло- β -лактамазы) или молекулярным классам А и D (сериновые карбапенемазы). Гены, кодирующие карбапенемазы, входят в состав мобильных генетических элементов, что способствует их быстрому распространению в госпитальной среде. Обзор содержит данные о распространенности карбапенемаз различных типов и методах их обнаружения.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, энтеробактерии, меропенем, имипенем, карбапенемазы, металло- β -лактамазы

D.V. Tapalski, V.A. Osipov, S.V. Zhavoronok

CARBAPENEMASES OF GRAM-NEGATIVE PATHOGENS: SPREAD AND METHODS OF DETECTION

Acquired carbapenemases are important resistance determinants in Gram-negative pathogens, including Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative non-fermenters. These enzymes belonging to either molecular class B (metallo- β -lactamases) or molecular classes A and D (serine carbapenemases). Carbapenemases encoding genes are associated with mobile genetic elements that allow their rapid dissemination in the clinical setting. The review contain data about prevalence carbapenemases of various types and methods of their detection.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, enterobacteria, meropenem, imipenem, carbapenemases, metallo- β -lactamases

Карбапенемы являются наиболее эффективными препаратами для лечения тяжелых нозокомиальных инфекций и инфекций, вызванных полимикробной флорой. Действие этой группы антибиотиков характеризуется широким спектром активности, низкой токсичностью, хорошими фармакокинетическими параметрами. Как и все β -лактамы антибиотики, карбапенемы являются ингибиторами синтеза клеточной стенки, блокирующими транспептидазную активность пенициллинсвязывающих белков. Они обладают высокой стабильностью к расщеплению большинством β -лактамаз, включая β -лактамазы расширенного спектра и AmpC. Вместе с тем, приобретенная устойчивость к антибиотикам данной группы становится в настоящее время все более распространенной среди грамотрицательных неферментирующих бактерий и энтеробактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций [1].

Формирование устойчивости к β -лактамам у грамотрицательных бактерий связано с различными механизмами, включающими изменение проницаемости клеточной стенки из-за возникновения дефектов пориновых каналов и активацию систем эффлюкса [2]. Однако наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция бактериальных ферментов, гидролизующих β -лактамно кольцо антибиотиков – β -лактамаз.

Классификация и распространение карбапенемаз

Структурная классификация β -лактамаз учитывает первичную аминокислотную структуру ферментов и пространственную структура активного центра. Функциональная классификация основана на субстратной специфичности ферментов (способности к преимущественному гидролизу β -лактамов определенных групп – пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов). По структуре первичной аминокислотной последовательности β -лактамазы разделяют на четыре молекулярных класса – А, В, С и D [3]. Ферменты классов А, С и D являются гидролазами серинового типа, ферменты класса В являются металлосодействующими гидролазами, в активном центре которых содержится один или два атома цинка. Способностью гидролизовать карбапенемы обладают отдельные представители разных молекулярных классов β -лактамаз [4], однако наиболее распространенными и клинически важными в настоящее время являются сериновые карбапенемазы КРС (молекуляр-

ный класс А), металло- β -лактамазы-МБЛ (молекулярный класс В) и отдельные ОХА-ферменты (молекулярный класс D)-подгруппы ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58 (рисунок 1).

Распространение клинически значимых приобретенных карбапенемаз среди отдельных видов грамотрицательных неферментирующих бактерий и энтеробактерий представлено в таблице.

Наиболее распространенным типом сериновых карбапенемаз молекулярного класса А являются КРС (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), активные в отношении пенициллинов, цефалоспоринов I-V поколений, карбапенемов, азтреонама. КРС-1 впервые описана у *K. pneumoniae* (Северная Каролина, США, 1996). Другие члены семейства КРС (КРС-2 – КРС-10) отличаются от КРС-1 единичными аминокислотными заменами, которые незначительно изменяют активность. Кроме *K. pneumoniae* ферменты этого типа были обнаружены и у других энтеробактерий-*K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp., а так же у *Pseudomonas aeruginosa*. В большинстве случаев отмечено клональное распространение КРС-продукторов. Гены bla_{KPC} часто входят в состав мобильных элементов (транспозоны Tn4401-типа), поэтому кроме клонального распространения возможен их горизонтальный перенос между штаммами [5, 6, 7].

Металло- β -лактамазы, относящиеся к молекулярному классу В, являются металлосодействующими гидролазами, в активном центре которых содержатся атомы цинка. Они гидролизуют не только карбапенемы, но и большинство других β -лактамов антибиотиков, включая пенициллины и цефалоспорины, однако не активны в отношении монобактамов (азтреонама). МБЛ не чувствительны к ингибиторам сериновых β -лактамаз (клавуланат, сульбактам, тазобактам), их активность МБЛ подавляется ЭДТА и другими

Таблица. Распространение клинически значимых приобретенных карбапенемаз среди грамотрицательных неферментирующих бактерий и энтеробактерий

Микроорганизм	МБЛ (класс В)	КРС (класс А)	ОХА (класс D)
Грамотрицательные неферментирующие бактерии			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+		++
<i>Acinetobacter</i> spp.	+		+
Энтеробактерии			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	++	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+		+
<i>Providencia</i> spp.	+		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	
<i>Enterobacter</i> spp.	+	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	
<i>Morganella morganii</i>	+		
<i>Salmonella enterica</i>		+	
<i>Raoultella</i> spp.		+	

Примечания:

"+" - распространенный фермент для данного вида

"+" - единичные сообщения о наличии фермента у представителей данного вида



Рисунок 1. Классификация карбапенемаз

Клинический обзор

металлохелаторами, однако использование этих соединений в качестве ингибиторов МБЛ невозможно в антибактериальной терапии вследствие их высокой токсичности для макроорганизма [8].

Большинство генов, кодирующих продукцию приобретенных МБЛ, входят в состав интегронов, которые обладают высокой мобильностью и быстро распространяются между микроорганизмами с помощью плазмид и транспозонов. Кроме генов МБЛ, такие интегроны содержат в своем составе дополнительные генные кассеты, несущие детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам других классов (например, аминогликозидам и хлорамфениколу) и дезинфектантам. Также в составе интегронов могут присутствовать гены других β -лактамаз, поэтому передача интегронов приводит к одномоментной передаче сложного фенотипа множественной лекарственной устойчивости [9].

Наиболее часто приобретенные МБЛ выявляются у *Pseudomonas aeruginosa*, реже у других грамотрицательных неферментирующих бактерий, например, *Acinetobacter* spp. Отдельные случаи продукции МБЛ у представителей семейства *Enterobacteriaceae*. В настоящее время существует по меньшей мере девять различных типов приобретенных металло- β -лактамаз: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM, TMB. Важнейшими по распространенности и клинической значимости являются МБЛ типов IMP, VIM и NDM.

МБЛ VIM (Verona Imipenemase) впервые была идентифицирована у штамма *Pseudomonas aeruginosa* в Италии в генетической кассете в интегрене 1-го класса. Эта МБЛ позже была обнаружена у *E. coli* в Греции и *K. pneumoniae* во Франции [10, 11]. МБЛ VIM-2 впервые была идентифицирована у штамма *Pseudomonas* из южной Франции в 1996 году. VIM-2 имеет высокую степень гомологии с VIM-1 и кодируется ге-

нетической кассетой, расположенной на неконъюгативной плазмиде размером 45 т.п.н. О выделении штаммов *P. aeruginosa*, продуцирующих МБЛ VIM-2 в последующем сообщалось во многих странах мира, что свидетельствует о глобальном распространении этого фермента [12]. VIM-3 впервые был выделен у бактерий нескольких видов в Тайване [13]. К настоящему времени описано 25 ферментов, относящихся к группе VIM, большинство из них являются эндемичными для определенных географических территорий. Исключение составляют VIM-1 и VIM-2, которые в настоящее время получили международное трансконтинентальное распространение.

МБЛ типа NDM. Новый тип МБЛ получил обозначение NDM-1 от «New Delhi Metallo-beta-lactamase-1», поскольку первый штамм, продуцирующий этот фермент, был выделен у гражданина Швеции индийского происхождения, поступившего в больницу Нью-Дели в 2008 году с инфекцией мочевого тракта [14]. Карбапенемаза NDM-1, кодируемая плазмидным геном, подвержена активному горизонтальному переносу и очень быстро распространяется между разными видами грамотрицательных бактерий. Впервые описанная у *K. pneumoniae*, позже она была обнаружена и у других энтеробактерий - *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, а также у неферментирующих бактерий - *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas*. В настоящее время NDM-1 вышел за пределы Индии, Пакистана, Великобритании и Северной Ирландии, где первоначально был описан, и уже зарегистрирован в США, Канаде, Австралии, Бельгии, Японии, Швеции, Вьетнаме, Южной Корее, Тайване, Китае, Словении [15].

ОХА-карбапенемазы являются β -лактамазы серинового типа (класс D), наиболее важным свойством которых является активность в отношении карбапенемов. Исторически всем β -лактамазам класса D присваивается наименование ОХА, но не все они обладают карбапенемазной активностью. К настоящему времени описано более 120 β -лактамаз молекулярного класса D, порядка 50 из них гидролизуют карбапенемы. Первая ОХА- β -лактамаза с карбапенемазной активностью была впервые описана в 1993 году. Фермент был обнаружен у полиантибиотикорезистентного *A. baumannii*, выделенного в 1985 году от пациента в Шотландии. Этот фермент изначально получил обозначение ARI-1 (от «*Acinetobacter*, резистентный к имипенему»), а позднее – ОХА-23. В дальнейшем ОХА-карбапенемазы различных типов обнаруживались среди штаммов *Acinetobacter baumannii* во всем мире, а также у отдельных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. В настоящее время описано девять кластеров ОХА- β -лактамаз с карбапенемазной активностью: ОХА-23, ОХА-24, ОХА-51, ОХА-58,

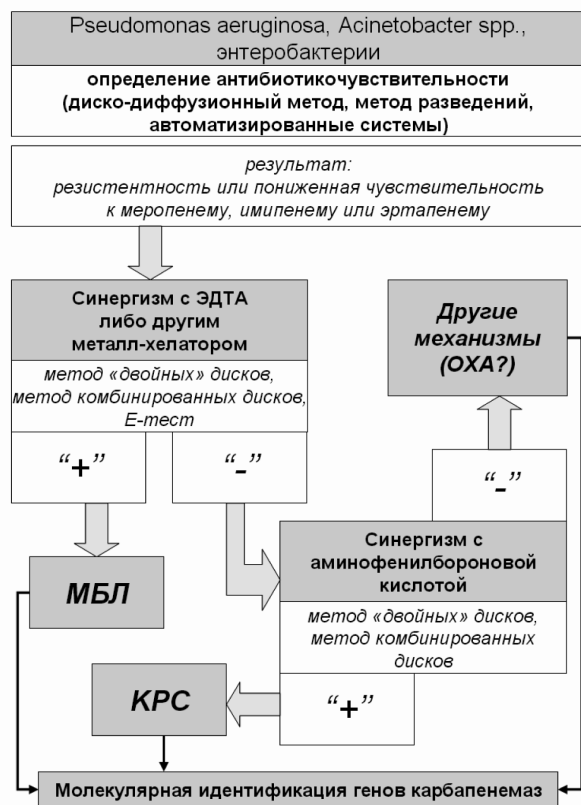


Рисунок 2. Алгоритм выявления карбапенемазной активности

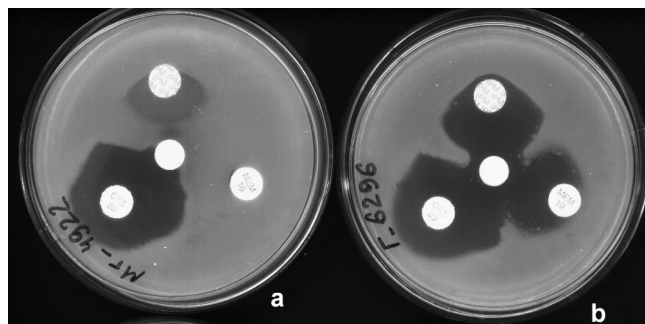


Рисунок 3. Выявление продукции МБЛ с помощью метода «двойных дисков с ЭДТА». Положительные результаты (МБЛ+): а – штамм *Pseudomonas aeruginosa* №4922, г. Могилев; б – штамм *Pseudomonas aeruginosa* №6296, г. Гомель

ОХА-55, ОХА-48, ОХА-50, ОХА-60, ОХА-62, с идентичностью аминокислотных последовательностей между представителями различных кластеров от 40 до 70%, внутри кластера идентичность последовательностей составляет 92,5% и более [4, 16]. ОХА-карбапенемазы не ингибируются клавулановой кислотой, сульбактамом, тазобактамом, а также устойчивы к действию ЭДТА и других металлохелаторов.

Таким образом, из всего многообразия β -лактамаз карбапенемазы представляют собой наибольшую угрозу, так как обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающем практически все классы β -лактамов антибиотиков. Большинство из них не чувствительны к основным ингибиторам β -лактамаз, используемым в современной медицине. Гены карбапенемазы часто сцеплены с другими детерминантами антибиотикорезистентности и включены в состав высоко мобильных интегронов, способных быстро распространяться между бактериями с помощью плазмид и транспозонов. В результате приобретения генов карбапенемаз нередко формируются отдельные эпидемиологически значимые клоны поли- и панрезистентных микроорганизмов, способны быстро распространяться на обширных географических территориях и вызывать серьезные инфекции, трудно поддающиеся терапии. Детекция этого механизма резистентности важна не только для назначения оптимальной этиотропной терапии пациенту, но и для эпидемиологического контроля распространения резистентных штаммов и разработки мероприятий инфекционного контроля.

В связи с опасностью широкого распространения карбапенемаз возникла необходимость внедрения в рутинную практику лабораторий клинической микробиологии фенотипических методов выявления карбапенемаз грамотрицательных бактерий. Фенотипические тесты могут дать важную информацию еще до проведения более дорогих молекулярно-генетических методов, доступных для использования как правило только в референсных лабораториях.

Методы детекции карбапенемаз

Поскольку наиболее значимым маркером продукции карбапенемаз является устойчивость к карбапенемам, необходимо проводить тестирование на наличие приобретенных карбапенемаз у всех штаммов *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. и энтеробактерий, проявляющих сниженную чувствительность или устойчивость к карбапенемам [16]. На рисунке 2 представлен алгоритм выявления карбапенемазной активности у грамотрицательных бактерий. Согласно рекомендациям Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) необходимо проведение дополнительных скрининговых тестов на выявление карбапенемаз для всех изолятов энтеробактерий с минимальной ингибирующей

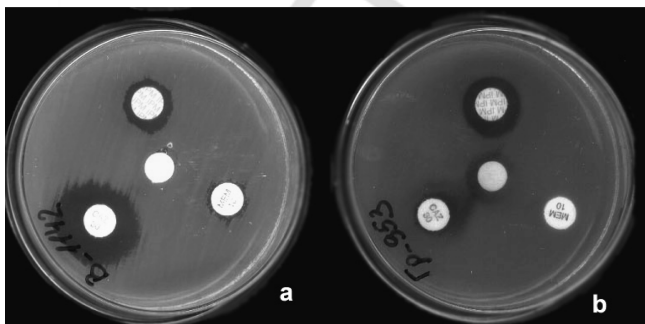


Рисунок 4. Выявление продукции МБЛ с помощью метода «двойных дисков с ЭДТА». Отрицательные результаты (МБЛ): а – штамм *P.aeruginosa* №1142, г. Витебск; б – штамм *P.aeruginosa* №953, г. Гродно

концентрацией (МИК) для меропенема, имипенема или эртапенема >2 мг/л, устойчивых по крайней мере к одному из цефалоспоринов III поколения (цефотаксиму, цефтриаксону или цефтазидиму). При использовании диско-диффузионного метода подлежат дальнейшему скринингу на наличие карбапенемаз изоляты с диаметрами зон подавления роста для меропенема или эртапенема >21 мм [17].

Методы выявления МБЛ основаны на выявлении синергизма между β -лактамами – цефтазидимом, имипенемом и меропенемом, которые являются субстратами для МБЛ, и металлохелаторами – веществами, связывающими ионы цинка из активного центра металло- β -лактамаз и подавляющими их гидролитическую активность. Наиболее широко в качестве хелатирующего агента для детекции МБЛ используется этилендиаминтетраацетат (ЭДТА). Вместо ЭДТА возможно использование дипиколиновой кислоты, 2-меркаптопропионовой кислоты и других тиолов. Для выявления синергизма используется ряд фенотипических методов: метод двойных дисков, метод комбинированных дисков, оценка снижения МИК карбапенемов в присутствии ЭДТА с помощью E-тестов или методом микроразведений в бульоне [18].

Простым, эффективным и доступным методом выявления МБЛ, пригодным для использования в практических микробиологических лабораториях, является метод двойных дисков с ЭДТА [19]. Используют 0,5 М раствор ЭДТА, для его получения 18,6 г трилона Б ($\text{Na}_2\text{-ЭДТА}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) растворяют в дистиллированной воде, доведя объем до 100 мл. С помощью NaOH доводят pH до 8,0, после чего полученный раствор стерилизуют автоклавированием и хранят в холодильнике.

Готовят инокулюм из чистой суточной культуры исследуемого микроорганизма. Несколько колоний стерильным хлопковым тампоном вносят в пробирку с 3 мл стерильного физиологического раствора. Взвесь бактериальных клеток доводят до мутности 0,5 по МакФарланду и наносят стерильным тампоном на поверхность агара Мюллера-Хинтона. Через 5 – 10 мин после инокулирования на подсыхшую поверхность агара накладываются диски согласно следующей схеме: в центр – пустой стерильный диск, на который затем пипеткой наносится 10 мкл стерильного 0,5 М раствора ЭДТА (pH 8,0), по бокам от него на расстоянии 15 мм между центрами дисков – диски с цефтазидимом (30 мкг), имипенемом (10 мкг) и меропенемом (10 мкг). Посевы инкубируют в термостате при 35°C в течение 16-18 часов. С целью контроля качества параллельно с анализом испытуемых культур проводят исследование контрольных штаммов-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (отрицательный контроль) и штаммы, продуцирующие МБЛ известных типов (положительные контроли).

Образование расширенной зоны подавления роста между диском с ЭДТА и хотя бы одним из дисков, содержащих β -лактамы антибиотиков, расценивают как наличие продукции МБЛ у тестируемого микроорганизма. Комбинацию из трех дисков (имипенем, меропенем, цефтазидим) используют для повышения чувствительности метода, поскольку некоторые штаммы могут проявлять синергизм только с каким-либо одним из антибиотиков.

С использованием метода двойных дисков с ЭДТА нами было исследовано 107 полиантибиотикорезистентных карбапенемрезистентных клинических изолятов *P.aeruginosa*, выделенных из клинического материала госпитализированных больных в 16 стационарах четырех областных центров Беларуси и г. Минска. продукция МБЛ выявлена у 19 из них [20]. Положительные и отрицательные результаты метода двойных дисков с ЭДТА представлены на рис. 3 и рис. 4.

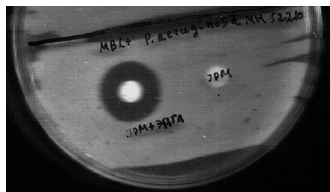


Рисунок 5. Выявление продукции МБЛ с помощью метода комбинированных дисков с ЭДТА, положительный результат (МБЛ+), штамм *P.aeruginosa* №52210, г. биологии. Минск

При использовании метода комбинированных дисков раствор металлохелатора наносится на диск с антибиотиком. После инокуляции Мюллер-Хинтона агара суспензией исследуемого микроорганизма на поверхность питательной среды на расстоянии не менее 30 мм между центрами накладывают по два диска с имипенемом и меропенемом. На один из них пипеткой наносят 5 мкл стерильного 0,5 М раствора ЭДТА (рН 8,0). Инкубацию проводят при 35°C в течении 16-18 часов. Сравнивают диаметры зон подавления роста в парах имипенем – имипенем/ЭДТА и меропенем – меропенем/ЭДТА. Увеличение зоны подавления роста на 7 мм и более при добавлении ЭДТА расценивается как положительный результат (рис. 5).

Еще один вариант фенотипической детекции МБЛ основан на использовании E-тестов. Etest® MBL (bioMérieux, Solna, Sweden) представляет собой двустороннюю полосу, на одной стороне которой нанесен градиент меропенема в диапазоне концентраций 0,125-8 мкг/мл, на другой – градиент меропенема в диапазоне концентраций 0,032-2 мкг/мл в сочетании с постоянной концентрацией ЭДТА [22]. Снижение минимальной ингибирующей концентрации меропенема в присутствии ЭДТА на 3 и более двукратных разведения (т.е. в 8 и более раз) свидетельствует о продукции МБЛ (рис.6).

В качестве ингибитора сериновых карбапенемаз класса А (КРС) используют аминоксифенолбороновую кислоту (АФБК). Для выявления синергизма между карбапенемами и АФБК используют методы двойных дисков и комбинированных дисков [23, 24], техника постановки которых подобна аналогичным методам для выявления МБЛ. В методе комбинированных дисков на один из дисков с карбапенемом наносится 10 мкл раствора АФБК с концентрацией 60 мг/мл (600 мкг на диск). Увеличение зоны подавления роста на 4 мм и более при добавлении АФБК расценивается как положительный результат. Еще одним рекомендованным методом фенотипического скрининга КРС является модифицированный Ходж-тест [16, 25].

Трактовка результатов фенотипических скрининговых тестов для выявления карбапенемаз не всегда однозначна, особенно в случаях, когда наблюдается продукция нескольких типов β-лактамаз одновременно. Определение ферментов ОХА-типа с помощью фенотипических тестов практически невозможно [4].

Предложены амплификационные методы идентификации генов карбапенемаз, принадлежащих к наиболее распространенным группам. Разработаны методы мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с последующим анализом кривых плавления полученных ампликонов для идентификации генов МБЛ металло-β-лактамаз [19]. Однако мультиплексная способность метода ПЦР, как правило, ограничена, что не позволяет одновременно детектировать большое количество генов.

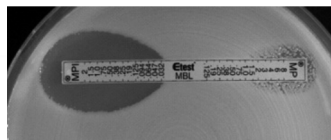


Рисунок 6. Выявление продукции МБЛ с помощью Etest® MBL, положительный результат (МБЛ+)

Перспективным методом идентификации как с точки зрения времени получения результата анализа, так и его информативности является метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах. Данная технология имеет значительные преимущества перед традиционными методами, так как позволяет проводить многопараметрический анализ, а также миниатюризировать исследуемый образец, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения [26].

В связи с появлением в отдельных лечебных учреждениях республики МБЛ-продуцирующих изолятов и угрозой быстрого клонального распространения продуцентов карбапенемаз с множественной лекарственной устойчивостью, в лабораториях клинической микробиологии назрела необходимость внедрения систем микробиологического мониторинга, направленного на выявление резистентности к карбапенемам среди клинических изолятов и расшировку ее механизмов. Микробиологический мониторинг должен включать фенотипическое выявление карбапенемаз у штаммов, устойчивых к меропенему и имипенему, или имеющих сниженную чувствительность к этим препаратам. Фенотипические тесты могут использоваться в рутинной практике локальных микробиологических лабораторий. Штаммы с выявленной в фенотипическом тесте продукцией карбапенемаз, а также штаммы с сомнительными результатами фенотипического теста должны передаваться в референсные лаборатории для выполнения молекулярно-генетических исследований (выявление генов МБЛ и молекулярно-генетическое типирование для оценки клональной родственности).

Литература

1. Галкин, Д. В. Карбапенемы через 20 лет после открытия: современные микробиологические и клинические аспекты // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2007. -Том 9. -№ 2. – С. 133-152.
2. Strateva, T., Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance // Journal of Medical Microbiology. – 2009. – Vol. 58. – P. 1133 – 1148.
3. Bush, K., Jacoby G.A., Medeiros A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1995. – Vol. 39. – P. 1211 – 1233.
4. Queenan, A. M., Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases // Clinical Microbiology Reviews. – 2007. – Vol. 20. – P. 440 – 458.
5. Walsh, T. R. Clinically significant carbapenemases: an update. Current Opinion in Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 21. – P. 367 – 371.
6. Pournaras, S., Protonotariou E., Voulgari E. et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae strains in Greece // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. -2009. – Vol. 64. – P. 348 – 352.
7. Woodford, N., Zhang J., Warner M. et al. Arrival of Klebsiella pneumoniae producing KPC carbapenemase in the United Kingdom // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – Vol. 62. – P. 1261 – 1264.
8. Gupta, V. Metallo beta lactamases in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species // Expert Opinion on Investigational Drugs. – 2008. – Vol. 17. – P. 131 – 143.
9. Walsh, T. R., Toleman M. A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? // Clinical Microbiology Reviews. – 2005. – Vol. 18. – P. 306 – 325.
10. Giakkoupi, P., Xanthaki A., Kanelopoulou M., et al. VIM-1 metallo-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae strains in Greek hospitals // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41. – P. 3893 – 3896.
11. Scoulica, E. V., Neonakis I. K., Gikas A. I., Tselentis Y. J. Spread of bla VIM-1 – producing E. coli in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla VIM-1 metallo-β-lactamase gene // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2004. – Vol. 48. – P. 167 – 172.
12. Woodford, N., Turtton J. F., Livermore D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resist-

ance // FEMS Microbiology Reviews. – 2011. – Vol. 35. – P. 736 – 755.

13. Yan, J. J., Hsueh P. R., Ko W. C., et al. Metallo- β -Lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45. – P. 2224 – 2228.

14. Kumarasamy, K. K., Toleman M. A., Walsh T. R., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 10. – P. 597-602.

15. *Antimicrobial*, resistance: revisiting the «tragedy of the commons» // *Bulletin of the World Health Organization*.-2010.-Vol. 88.-P.805-806.

16. Miriagou, V., Cornaglia G., Edelstein M., et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues // *Clinical Microbiology and Infection*.-2010. – Vol. 16.-P 112 – 122.

17. *Clinical*, and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: CLSI, 2009.

18. Yong, D., Lee K., Yum J. H., et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. // *Journal of Clinical Microbiology*.-2002. – Vol. 40. – P. 3798 – 3801.

19. Шевченко, О. В., Эйдельштейн М. В., Степанова М. Н. Металло- β -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2007. – Т. 9. – №3. – С. 211 – 218.

20. Тапальский, Д. В., Осипов В. А., Левшина Н. Н. и др. Карбапенемрезистентные штаммы синегнойной палочки – продуценты

метало-бета-лактамаз: распространение в различных регионах Беларуси // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр.* – Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2010. – Вып.3. – С.658-662.

21. Тапальский, Д. В., Осипов В. А., Склеенова Е. Ю. и др. Значение металло- β -лактамаз в формировании и распространении устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам // *Достижения медицинской науки Беларуси: реценз. науч.-практ. ежегодник*. – Минск: ГУ РНМБ, 2010. – Вып.XV. – С.146-147.

22. Walsh, T. R., Bolmstrom A., Qwarnstrom A., Gales A. Evaluation of a new E-test for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2002. – Vol. 40. – P. 2755 – 2759.

23. Pasteran, F., Mendez T., Guerriero L., et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – Vol. 47. – P.1631 – 1639.

24. Tsakris, A, Kristo I, Poulou A et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory // *Journal of Clinical Microbiol.* – 2009. – Vol. 47. – P. 362 – 367.

25. Stuart, C. J., Leverstein-Van Hall M.A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2010. – Vol.36. – P. 205-210.

26. Уляшова, М. М., Халилова Ю. И., Рубцова М. Ю. и др. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D // *Acta Naturae*. – 2010.-№ 3. – С.116-125.

Поступила 19.03.2012 г.